

# 动物克隆及其相关重编程机制研究

艾怡瑞 刘思奇 李世峰\* 李逸平\*

(中国科学院分子细胞卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室,  
上海市分子男科学重点实验室, 上海 200031)

**摘要** 体细胞核移植技术已成功克隆出绵羊、牛、小鼠、猪、猕猴等多种动物, 克隆技术也被广泛应用于畜牧业、生物医学、基础科研等众多领域。但是克隆的成功率较低, 且克隆后代经常出现各种畸形, 关键原因之一就是供体细胞重编程不完全。供体细胞核在进入去核卵后, 会经历核膜降解、早熟染色质凝集、卵母细胞激活、核扩张、合子基因组激活等一系列事件, 期间会发生染色质结构重编程、组蛋白变体合并、组蛋白修饰重编程、DNA甲基化重编程等多种重编程过程, 只有重编程成功的胚胎才能正常发育成个体。该文总结了近年来克隆中重编程研究的进展并介绍了新兴的半克隆技术, 希望以此加深对重编程机制的了解, 从而使克隆的效率得到提高。

**关键词** 克隆; 体细胞核移植; 半克隆技术; 重编程

## Research Progress on Animal Cloning and Related Reprogramming Mechanisms

AI Yirui, LIU Siqi, LI Shifeng\*, LI Yiping\*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Sheep, cattle, mice, pigs, rhesus monkeys and other animals have been successfully cloned using somatic cell nuclear transfer technology. Cloning technology is also widely used in stock farming, biomedicine, basic scientific research and many other fields. However, the success rate of cloning is low, and the cloned progeny often have various abnormalities. One of the key reasons is the incomplete reprogramming of donor cells. After the donor nucleus enters the enucleated egg, it will undergo a series of events such as nuclear envelope degradation, premature chromosome condensation, oocyte activation, nuclear expansion, and zygotic genome activation, during which chromatin structure reprogramming, histone variant integration, histone modification reprogramming, DNA methylation reprogramming and other reprogramming processes will occur. Only successfully reprogrammed embryos can develop into individuals normally. This paper summarizes the progress of reprogramming research in cloning in recent years and introduces emerging semi-clone technology, hoping to deepen the understanding of the reprogramming mechanism, so that the efficiency of cloning can be improved.

**Keywords** clone; somatic cell nuclear transfer; semi-clone technology; reprogramming

## 1 克隆技术

### 1.1 克隆技术的发展历程

克隆是指通过体细胞核移植(somatic cell nu-

clear transfer, SCNT)技术产生基因型一致的动物个体, 即把供体细胞的细胞核移植到去核的受体卵母细胞的细胞质中, 从而产生与供体细胞基因组相同

收稿日期: 2022-08-26

接受日期: 2022-11-24

国家重点研发计划专项(批准号: 2019YFA0109900)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54921415, E-mail: sfi01@sibcb.ac.cn; yipingli@sibcb.ac.cn

Received: August 26, 2022

Accepted: November 24, 2022

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2019YFA0109900)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-54921415, E-mail: sfi01@sibcb.ac.cn; yipingli@sibcb.ac.cn

的克隆后代。在动物中最早实现体细胞克隆技术是在1962年, GURDON实验室<sup>[1]</sup>使用非洲爪蟾蝌蚪中已分化的小肠上皮细胞作为供体, 成功获得了存活的蝌蚪后代, 这是首例成功使用去核卵母细胞将已分化的体细胞重编程为多能性状态的报道, 且他们发现使用分化程度越低的供体, 核移植成功率越高, 说明其重编程效率也越高。1997年WILMUT实验室<sup>[2]</sup>使用成年绵羊乳腺细胞成功克隆第一只哺乳动物“Dolly羊”, 这是克隆历史上的一个里程碑事件, 将克隆技术推向了一个新的纪元。在随后的20多年里, 一系列哺乳动物都被成功克隆, 包括牛<sup>[3]</sup>、小鼠<sup>[4]</sup>、山羊<sup>[5]</sup>、猪<sup>[6]</sup>、兔子<sup>[7]</sup>、猫<sup>[8]</sup>、马<sup>[9]</sup>、狗<sup>[10]</sup>等。2018年, 中国科学院神经科学研究所非人灵长类平台的LIU等<sup>[11]</sup>使用幼年猕猴成纤维细胞和成年猕猴卵丘细胞成功克隆出存活的猕猴后代, 在国际上首次实现了非人类灵长类动物的体细胞克隆, 取得了举世瞩目的成就。在鱼类中, 早在1963年, TUNG实验室<sup>[12]</sup>就将雄性鲤鱼的遗传物质注入雌性鲤鱼的卵母细胞中获得了克隆鲤鱼。1973年, 他们又在硬骨鱼中进行了一系列核移植实验, 研究细胞核与细胞质在遗传表征中的影响, 并首次获得了鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质杂交的亚种克隆鱼, 这种具有特异性状的鱼, 被称为“童鱼”, 童第周也被誉为“中国克隆之父”。2002年, LEE等<sup>[13]</sup>使用长期培养的胚胎成纤维细胞作为供体成功获得了二倍体可育斑马鱼, 在斑马鱼中建立了靶向遗传操作的基础。

## 1.2 克隆技术的应用

克隆技术的成功使得它被应用于多个领域中。在畜牧业中, 克隆技术可以拯救濒危动物, 保护物种多样性, 还可以用来克隆一些有经济价值的牲畜<sup>[14]</sup>, 结合基因修饰技术, 例如CRISPR/Cas9技术, 可以快速产生具有高产、抗病等优良性状的转基因牲畜种群<sup>[15]</sup>。在生物医学领域, 克隆技术可以制造生物反应器用于生产治疗性蛋白<sup>[16]</sup>, 建立动物模型研究人类疾病机理<sup>[17]</sup>, 以及产生基因修饰的异种器官用于病人器官移植<sup>[18]</sup>。2013年, TACHIBANA实验室<sup>[19]</sup>通过核移植技术成功获得了人类核移植胚胎干细胞(nuclear transfer embryonic stem cells, ntESCs), 这类干细胞系的基因型与供体病人完全一致, 不仅可以用于研究相应的疾病机理, 并且在对干细胞进行基因编辑修复使其恢复正常以后, 再将其移植回病人体内, 可以避免像传统的异源移植那样引起排异反

应, 这奠定了治疗性克隆的基础, 与最近流行的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)有相似的应用。我国学者也已经做过类似的实验, 例如SHENG实验室<sup>[20]</sup>曾将成人皮肤细胞的细胞核移植到去核的兔卵母细胞中, 成功获得融合胚胎, 并从融合胚胎的细胞团中提取出可用于进一步研究的人胚胎干细胞。在基础研究中, 克隆技术可以用于探究细胞核与细胞质之间的交互作用以及理解细胞命运决定的机制, 并且是一个研究重编程和表观修饰的优良工具<sup>[21]</sup>。

## 1.3 克隆技术中存在的问题

体细胞克隆在众多物种中已经取得成功, 出生正常的克隆动物个体可以正常发育并传代, WAKAYAMA等<sup>[22]</sup>通过在SCNT过程中使用组蛋白去乙酰化抑制剂, 成功连续克隆超过25代小鼠。但这项技术还存在诸多问题, 首先, 在所有物种中的克隆成功率都非常低, 普遍只有1%~5%。其次, 克隆个体经常出现各种畸形, 例如呼吸困难和血液循环受阻, 这会导致克隆动物在出生后迅速死亡<sup>[2]</sup>。即使出生后的克隆幼崽外观正常, 它们可能也会存在免疫功能失调、肾脏或大脑畸形等问题, 这会导致它们在随后的不同发育阶段死亡<sup>[23]</sup>。存活下来的克隆动物大部分都存在过度生长的表型, 这些克隆动物胎儿和胎盘尺寸都明显大于正常个体, 被称为巨型胎儿综合征<sup>[24]</sup>。

## 2 克隆过程中的重编程

体细胞克隆成功率低和个体出现畸形的一个关键原因, 就是供体细胞重编程失败。重编程指在不改变基因序列的情况下, 通过表观遗传修饰如DNA甲基化来改变细胞命运的过程, 使细胞从一种基因表达谱转换为另一套不同的表达谱。受精卵是生命周期中全能性最高的细胞, 因此核移植也是最早被用于体细胞重编程的经典方法。此外, 还有胞质融合、细胞融合、过表达转录因子等方法也可诱导重编程。2006年, YAMANAKA实验室<sup>[25]</sup>通过过表达4个转录因子: Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc, 成功将小鼠胚胎成纤维细胞诱导为多能干细胞, 这也是重编程领域的里程碑事件, 揭示了重编程的部分机制, 启发了科学家们对核移植机制的研究。

在核移植过程中, 供体细胞核进入受体卵质中后, 会经历一系列的变化: 首先, 供体细胞核膜迅速降解, 并在成熟促进因子(maturation promoting fac-

tor, MPF)的作用下形成凝集的分裂中期样染色体,这一过程被称为早熟染色质凝集(pre-mature chromosome condensation, PCC)。在PCC过程中,大部分染色质结合蛋白都从基因组上脱落。有研究表明,PCC对于克隆胚胎重编程以及后续的发育是十分重要的<sup>[26]</sup>。在哺乳动物正常受精过程中,精子进入卵母细胞后,其携带的精子特异性磷脂酶C zeta会触发卵母细胞中的钙离子振荡,使卵母细胞激活,退出M期并启动后续发育程序<sup>[27]</sup>。但是在SCNT胚胎中,供体细胞缺少精子特异性磷脂酶C zeta,因此需要对胚胎进行人工激活。在小鼠SCNT中,通常使用氯化铯处理胚胎使其激活;在灵长目SCNT中,普遍对胚胎使用电脉冲或钙离子载体进行处理,并且在培养基中添加环十二碳三烯或者6-二甲氨基嘌呤来使其激活<sup>[28]</sup>。在激活后,供体细胞核进入G<sub>1</sub>期并形成核膜,这一过程通过核扩张完成,供体细胞核合并大量母源蛋白并且尺寸变大,其被称为伪原核<sup>[29]</sup>,随后克隆胚胎开启DNA的复制。在哺乳动物中,随着合子DNA的复制,DNA的甲基化水平也逐渐降低,直到合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)并开始从头甲基化后,DNA甲基化水平才再次升高。

在上述过程中,卵质对体细胞供体核进行重编程,主要包括组蛋白变体合并、组蛋白修饰重编程、DNA甲基化重编程、染色质结构重编程、转录组重编程和X染色体重编程等<sup>[30]</sup>。

## 2.1 组蛋白变体合并

在哺乳动物正常的受精过程中,原本包裹精子基因组的鱼精蛋白经历了全局重塑,被一些母源组蛋白,例如H3.3<sup>[31]</sup>、H2AX<sup>[32]</sup>替换,在SCNT胚胎中,也出现了类似的组蛋白变体的剧烈交换。连接组蛋白H1是染色质结构和功能的关键调节因子,有研究发现,哺乳动物的卵母细胞中存在特异性的连接组蛋白H1foo,其分布于生发泡期卵母细胞、MII期卵母细胞以及第一极体中。在受精卵排出第二极体后,就可以在膨胀的精子头部中检测到H1foo,说明发生了组蛋白H1变体的替换。在使用小鼠卵丘细胞和肌肉细胞作为供体的SCNT胚胎中均检测到H1foo的替换,这个过程在核移植后5 min内就开始发生,并且在1 h后完全替换供体核的H1<sup>[33]</sup>。类似地,在哺乳动物中,组蛋白变体H3.3A和H3.3B由两个不同的基因*h3f3a*和*h3f3b*编码,母源H3.3合并到解聚精子核中对于受精过程中形成雄原核是必需的,并且对于早期

胚胎的发育和基因组完整性至关重要。在使用小鼠卵丘细胞作为供体的SCNT胚胎中,观察到母源H3.3逐渐被合并到供体细胞核中,而供体核来源的H3.3在激活后1~2 h逐渐丢失<sup>[34]</sup>。如果将卵母细胞中的组蛋白变体H3.3敲低,会使SCNT胚胎的发育潜力显著降低,大多数胚胎将会在二细胞或四细胞期停滞,只有少数胚胎能发育到桑葚胚或囊胚期。H3.3敲低还会影响供体体细胞重编程的效率,并且一些关键多能性基因会下调,注射外源H3.3 mRNA可以回补这一现象,表明H3.3是卵母细胞重编程的一个关键母源因子<sup>[35]</sup>。不仅仅是体细胞核移植中存在组蛋白变体合并现象,研究人员还观察到小鼠ESC供体核进入去核卵母细胞后,供体细胞来源的组蛋白H3变体H3.1、H3.2、H3.3,还包括H2A和H2A.Z,都迅速从供体核上消失,同时卵母细胞储存的组蛋白H3变体和H2A.X会合并到供体核中。研究这些组蛋白变体在SCNT中发挥的作用将有助于我们更好地理解SCNT重编程过程。

## 2.2 组蛋白修饰重编程

组蛋白修饰包括乙酰化、甲基化、泛素化、磷酸化等,成功的SCNT重编程也需要有供体细胞组蛋白修饰从体细胞模式到合子模式的转变。早期的一项免疫染色研究揭示了SCNT胚胎和体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)胚胎具有组蛋白乙酰化和甲基化模式的全局差异<sup>[36]</sup>。最近的一项研究开发出一种全新的SCNT胚胎2细胞期和4细胞期的活体检测系统,可以精确追踪活体胚胎的发育命运。研究人员通过对具有不同发育命运的SCNT胚胎进行单细胞转录组测序,发现H3K9me3去甲基化酶Kdm4b和Kdm5b是SCNT胚胎发育的关键因子,并且供体细胞中大部分H3K9me3富集的启动子在SCNT胚胎2细胞阶段都被去甲基化,表明了SCNT过程中全局的H3K9me3重编程。不过,在SCNT 2细胞期胚胎中仍有一些区域没有被去甲基化,暗示H3K9me3去甲基化可能是SCNT重编程中的一个限制因素<sup>[37]</sup>。在克隆牛中也发现其他的H3K9me3去甲基化酶Kdm4e对于SCNT胚胎的成功重编程是必需的<sup>[38]</sup>。这些结果都表明,SCNT成功重编程普遍需要H3K9me3的去甲基化。为了克服H3K9me3这一重编程障碍,研究人员向小鼠SCNT胚胎中注射了*Kdm4d* mRNA,发现其不仅可以挽救胚胎ZGA的缺陷,也可以改善胚胎在移植前的发育停滞现象,将克隆小鼠的出生率从

1%提高至8%<sup>[39]</sup>。值得注意的是, H3K9me3这一重编程障碍在哺乳动物中似乎具有保守性, 向人类SCNT胚胎中注射编码人类H3K9me3去甲基化酶*KDM4A*的mRNA, 可以有效促进其ZGA过程, 提高胚胎发育至囊胚期的比例, 最终成功获得人类ntESCs<sup>[40]</sup>。随后, 在猪<sup>[41]</sup>、牛<sup>[38]</sup>、猴子<sup>[11]</sup>中也分别证明了向SCNT胚胎中注射相应的*H3K9me3*去甲基化酶mRNA可以提高克隆效率。除此之外, 用TSA(一种组蛋白脱乙酰酶抑制剂)处理小鼠SCNT胚胎也可以提高其发育能力, 不过使用TSA处理注射过*Kdm4d* mRNA的小鼠SCNT胚胎并不能进一步提升胚胎的发育能力, 说明这两种试剂的功能出现了重叠, 暗示TSA的作用机制可能和*Kdm4d* mRNA相似, 也与H3K9me3的移除有关<sup>[39]</sup>。

最近H3K27me3也被发现是SCNT重编程的一个障碍。早期的一项研究发现, SCNT小鼠E13.5胎盘中三个基因*Sfmbt2*、*Gab1*和*Slc38a4*出现异常表达, 这些基因在正常胚胎的胎盘中呈现父源等位基因特异性表达, 但是在SCNT胚胎的胎盘中表现出双等位基因表达<sup>[42]</sup>。由于这些印记基因对于胎盘正常发育十分重要, 因此其印记丢失可能会引起胎盘增大, 这也是哺乳动物克隆中经常出现的一种畸形。随后, 小鼠SCNT囊胚期胚胎的H3K27me3分布也被成功定位, 与IVF囊胚期胚胎进行对比发现, 尽管SCNT胚胎H3K27me3甲基化在全局被成功重编程, 但仍有一些异常甲基化区域, 几乎所有可以检测的H3K27me3依赖性印记基因在囊胚期都丢失了它们的印记, 变成双等位基因表达<sup>[43]</sup>。这些基因的印记丢失可能是因为其供体本身就缺少H3K27me3印记, 继而导致小鼠SCNT胚胎移植后发育停滞。有趣的是, 在斑马鱼中目前还没有发现印记基因的存在, 虽然克隆斑马鱼可能没有印记基因的干扰, 但是其克隆效率也只有2%左右。

### 2.3 DNA甲基化重编程

除了组蛋白修饰外, DNA甲基化也是另一种主要表观修饰。在哺乳动物中, DNA甲基化由DNA甲基转移酶建立和维持, 5-甲基胞嘧啶形式的DNA甲基化则可通过TET双加氧酶介导的氧化反应主动逆转为未修饰的胞嘧啶<sup>[44]</sup>。在小鼠的移植前发育过程中, DNA经历了广泛的主动和被动去甲基化进程, 甲基化水平在囊胚期达到最低点<sup>[45]</sup>。由于体细胞基因组的大部分CpG岛都是高度甲基化的, 所以其全

局去甲基化对于SCNT重编程是必要的。一些研究团队发现在小鼠受精卵中, TET3在雄原核中特异性富集, 将5-甲基胞嘧啶转变为5-羟甲基胞嘧啶。而在SCNT胚胎中, 卵母细胞储存的TET3同样可以定位到伪原核中并诱导5-甲基胞嘧啶向5-羟甲基胞嘧啶转变, 表明在SCNT胚胎中也发生了主动去甲基化<sup>[46]</sup>。过去的一项研究发现小鼠SCNT胚胎直到4细胞阶段依然维持高甲基化水平, 与供体卵丘细胞相似, 表明SCNT胚胎全局去甲基化可能需要经历好几轮DNA复制。最近的一项研究使用全基因组重亚硫酸盐测序技术, 揭示了小鼠SCNT囊胚期胚胎的DNA甲基化图谱, 发现其与IVF胚胎类似, 都处于一个低甲基化水平<sup>[43]</sup>。鉴于DNA复制依赖性稀释是小鼠IVF胚胎移植前发育过程中DNA去甲基化的主要驱动力, 以上结果表明小鼠SCNT胚胎中同样使用DNA复制依赖性去甲基化机制, 在其他哺乳动物中可能也是如此。有趣的是, 在斑马鱼中, 父源基因组在受精后始终保持高甲基化水平, 而母源基因组甲基化水平持续升高直到同样达到高甲基化水平<sup>[47]</sup>, 表明不同物种受精后胚胎的DNA甲基化重编程方式有所不同。

### 2.4 染色质结构重编程

核小体在基因组上的定位由染色质重塑因子动态调节, 并且在限制DNA可及性上起重要作用, 因此, 核小体定位和相关联的染色质可及性改变被认为是SCNT中体细胞向全能性细胞转变的一种全局重编程。近期研究人员使用liDNase-seq分析了小鼠SCNT胚胎1细胞期和供体卵丘细胞的染色质可及性图谱, 揭示出SCNT胚胎被激活后12 h以内供体细胞的全局染色质可及性经历了快速的重编程, 转变为体外受精来源的合子模式<sup>[48]</sup>。尽管全局染色质可及性被重编程, 但与IVF胚胎的染色质结构重编程相比, 仍有一些区域对于重编程具有抵抗性, 其染色质可及性没有转变为全能性状态。在供体体细胞和SCNT 2细胞期胚胎中, 这些区域富集了异染色质标记H3K9me3, 而H3K9me3也被认为是表观重编程的一个阻碍。还有研究团队使用经过优化的少量细胞全基因组染色质构象捕获技术, 对小鼠SCNT胚胎发育过程进行连续采样, 并详细描绘了SCNT植入前胚胎染色质高级结构的动态变化过程, 与正常受精胚胎数据进行比较分析后发现, SCNT胚胎在2细胞期的远距离相互作用较正常受精胚胎明显降低。同时,

早期受精胚胎与SCNT胚胎的区室结构及拓扑相关结构域也存在着明显的差异。研究人员证实这是由于供体细胞基因组中持续存在的组蛋白H3K9me3修饰无法被正常擦除造成的。在SCNT胚胎中过表达组蛋白去甲基化酶Kdm4d来降低H3K9me3修饰水平, SCNT胚胎的染色质空间构象会趋向正常受精胚胎, 这也说明H3K9me3修饰是核移植胚胎中染色质高级结构重编程的重要障碍<sup>[49]</sup>。

### 2.5 转录组重编程

胚胎经历了表观重编程和染色质重塑, 这将会对其转录组产生影响。研究人员使用RNA-seq技术分析了SCNT胚胎的转录活性, 发现小鼠SCNT 2细胞期胚胎与IVF胚胎相比有超过1 000个基因没有被正确转录<sup>[39]</sup>。在供体卵丘细胞中高表达的基因, 超过80%都在SCNT胚胎和IVF胚胎2细胞阶段迅速下调, 表明这些基因都发生了重编程; 剩下的20%的基因在IVF胚胎中沉默, 但是在SCNT胚胎中依然维持高表达, 这些基因维持了它们在供体细胞中的转录状态, 在SCNT后没有被立刻重编程。在胚胎干细胞中特异性表达的一些基因, 在体细胞中被沉默, 在IVF胚胎中被激活, 这些基因中约85%在SCNT胚胎中也被成功激活, 表现出全局转录重编程; 剩下15%的基因在SCNT胚胎中抵抗重编程, 依然保持沉默状态。这些在ZGA中没有被成功激活的基因富集了转录抑制标志H3K9me3, 与上述结果一致。

### 2.6 X染色体重编程

在哺乳动物中, 雌性有两条X染色体, 雄性只有一条X染色体, 雌性需要失活一条X染色体来维持雄性和雌性之间平等的X连锁基因表达。这一过程受*Xist*基因调控, 其在需要被失活的X染色体上顺式表达, 转录出一种长非编码RNA, 通过招募转录抑制蛋白, 如PcG蛋白, 包裹住整条X染色体, 使其成为异染色质, 变成沉默状态<sup>[50]</sup>。在哺乳动物正常的胚胎发育过程中, X染色体失活出现在囊胚期, 内细胞团细胞的一条X染色体随机失活, 而滋养层细胞的父源X染色体失活<sup>[51]</sup>。然而在小鼠SCNT胚胎中, 出现了异位X染色体失活, 雌性来源的供体细胞中原本失活的X染色体会被重新激活, 随后在囊胚期检测到两条X染色体均转录*Xist* RNA, 造成X连锁基因表达异常。这一异常现象可以通过使用*Xist*基因杂合敲除的供体细胞改善, 最终可以将克隆小鼠的出生率提高约8倍<sup>[52]</sup>。此外, 通过向SCNT胚胎中注射*Xist*基因

的siRNA也可以提高雄性小鼠的出生率<sup>[53]</sup>。在克隆牛和克隆猪<sup>[41]</sup>中同样观察到*Xist*基因的异位表达, 暗示其机制具有保守性。

## 3 半克隆技术

近年来出现了一种新的显微操作技术, 被称为“半克隆”技术(semi-clone technology)。与克隆不同, 半克隆通过将单倍体供体细胞注射到未去核的卵母细胞中, 从而获得一半遗传物质来源于供体, 一半遗传物质来源于受体, 像正常受精那样结合了双亲基因特征的后代。

半克隆技术通常使用单倍体胚胎干细胞作为供体, 2009年HONG实验室<sup>[54]</sup>在青鳞鱼中成功建立了第一个脊椎动物单倍体胚胎干细胞系, 并将其作为供体细胞注射到卵母细胞中, 在667枚重构胚胎中有一枚成功发育到成年雌性, 且可以进行生殖传输, 将其命名为“Holly”。在小鼠中最早建立的单倍体胚胎干细胞系来源于孤雌胚胎, 研究人员通过应用2i培养条件以及使用流式细胞荧光分选技术进行单倍体富集成功建立了相对稳定的孤雌单倍体胚胎干细胞系, 并已经用于正向和反向遗传筛选<sup>[55]</sup>。随后, LI实验室<sup>[56]</sup>和ZHOU实验室<sup>[57]</sup>先后报道了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系的建立, 将其作为供体细胞注射到卵母细胞中, 成功产生了半克隆小鼠, 但由于单倍体干细胞的印记调控区域的DNA甲基化会在培养过程中逐渐丢失, 这些甲基化的丢失会影响重编程的效率, 因此只有2%的半克隆胚胎发育成健康个体。2015年, LI实验室<sup>[58]</sup>通过在单倍体干细胞中敲除两个父源印记调控区域(H19-DMR和IG-DMR)来模拟精子甲基化, 极大地提高了半克隆小鼠的发育潜能, 使其出生率提高至20%。随后, 对细胞培养条件的优化使单倍体胚胎干细胞可以稳定维持父源印记表观修饰的完整性, 使半克隆小鼠的出生率最高达到了30%<sup>[59]</sup>, 形成了一个高效稳定的小鼠半克隆体系。由此可以看出, 在半克隆过程中, 也有一些重编程异常的印记调控区域, 需要对其进行人为干预以提高半克隆成功率。

单倍体胚胎干细胞结合了单倍性和胚胎干细胞的多能性, 其只具有一套染色体, 有利于研究隐性表型基因突变, 因此它们在遗传分析、基因功能与性状研究中具有独特的优势; 并且其还具有多能性, 可以分化为各种细胞类型, 运用于正向和反向遗传

操作,可以在特定细胞类型中研究全基因组规模的生物学过程,因此单倍体胚胎干细胞也被称为“人造精子”。2019年,LI实验室和ZOU实验室<sup>[60]</sup>合作应用结合CRISPR-Cas9技术的半克隆技术,成功实现了小鼠骨发育相关基因的个体水平遗传筛选,并揭示Irx5作为骨发育过程中重要的调控因子,通过抑制PPAR $\gamma$ 促进成骨分化并抑制成脂分化,为小鼠发育过程中关键基因功能研究开辟了新的途径。

目前以半克隆技术为基础的动物“基因组标签计划”正受到更多的重视和关注,通过在目的蛋白后面加一个标签,就可以很方便地检测蛋白的定位和时空表达,将大大节省科研成本和时间。

#### 4 展望

近年来,随着技术的进步,利用单细胞转录组测序已经发现和鉴定了众多与克隆胚胎发育相关的重编程因子,揭示了许多新的基因和长非编码RNA的作用。然而,相关的重编程详细机制,迄今尚未得到深入研究。对SCNT所涉及的诸多因素和机制做进一步科学实验和系统分析,深入研究阐明SCNT介导的表观遗传重编程的分子机制,将是十分重要而艰巨的课题,其研究结果将为提高克隆效率、增强克隆胚胎的发育能力提供坚实的科学依据和方法。

#### 参考文献 (References)

- [1] GURDON J B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1962, 10: 622-40.
- [2] WILMUT I, SCHNIEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-3.
- [3] CIBELLI J B, STICE S L, GOLUEKE P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 280(5367): 1256-8.
- [4] WAKAYAMA T, PERRY A C, ZUCCOTTI M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-74.
- [5] BAGUISI A, BEHBOODI E, MELICAN D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456-61.
- [6] POLEJAEVA I A, CHEN S H, VAUGHT T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nature*, 2000, 407(6800): 86-90.
- [7] CHESNE P, ADENOT P G, VIGLIETTA C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 366-9.
- [8] SHIN T, KRAEMER D, PRYOR J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation [J]. *Nature*, 2002, 415(6874): 859.
- [9] GALLI C, LAGUTINA I, CROTTI G, et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin [J]. *Nature*, 2003, 424(6949): 635.
- [10] LEE B C, KIM M K, JANG G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells [J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 641.
- [11] LIU Z, CAI Y, WANG Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell*, 2018, 174(1): 245.
- [12] TUNG T C. Nuclear transplantation in fish [J]. *entia Sinica*, 1965, 14(8): 1244-5.
- [13] LEE K Y, HUANG H, JU B, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(8): 795-9.
- [14] KEEFER C L. Artificial cloning of domestic animals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(29): 8874-8.
- [15] GALLI C, LAGUTINA I, PEROTA A, et al. Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: current and future insights [J]. *Reprod Domest Anim*, 2012, doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02045.x.
- [16] LOTTI S N, POLKOFF K M, RUBESSA M, et al. Modification of the genome of domestic animals [J]. *Anim Biotechnol*, 2017, 28(3): 198-210.
- [17] SCOBIE L, DENNER J, SCHURMAN H J. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9, editorial commentary [J]. *Xenotransplantation*, 2017, doi: 10.1111/xen.12363.
- [18] TELUGU B P, PARK K E, PARK C H. Genome editing and genetic engineering in livestock for advancing agricultural and biomedical applications [J]. *Mamm Genome*, 2017, 28(7/8): 338-47.
- [19] TACHIBANA M, AMATO P, SPARMAN M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1228-38.
- [20] CHEN Y, HE Z X, LIU A, et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes [J]. *Cell Res*, 2003, 13(4): 251-63.
- [21] LONG C R, WESTHUSIN M E, GOLDING M C. Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer [J]. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(2): 183-93.
- [22] WAKAYAMA S, KOHDA T, OBOKATA H, et al. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(3): 293-7.
- [23] LANZA R P, CIBELLI J B, BLACKWELL C, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells [J]. *Science*, 2000, 288(5466): 665-9.
- [24] YOUNG L E, SINCLAIR K D, WILMUT I. Large offspring syndrome in cattle and sheep [J]. *Rev Reprod*, 1998, 3(3): 155-63.
- [25] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [26] KIM J M, OGURA A, NAGATA M, et al. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(3): 760-6.
- [27] SAUNDERS C M, LARMAN M G, PARRINGTON J, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development [J]. *Development*, 2002, 129(15): 3533-44.
- [28] LIU Y, HAN X J, LIU M H, et al. Three-day-old human unfertilized oocytes after *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection can be activated by calcium ionophore a23187 or stron-

- tium chloride and develop to blastocysts [J]. *Cell Reprogram*, 2014, 16(4): 276-80.
- [29] PRATHER R S, SIMS M M, FIRST N L. Nuclear transplantation in the pig embryo: nuclear swelling [J]. *J Exp Zool*, 1990, 255(3): 355-8.
- [30] MATOBA S, ZHANG Y. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 471-85.
- [31] AKIYAMA T, SUZUKI O, MATSUDA J, et al. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(10): e1002279.
- [32] NASHUN B, AKIYAMA T, SUZUKI M G, et al. Dramatic replacement of histone variants during genome remodeling in nuclear-transferred embryos [J]. *Epigenetics*, 2011, 6(12): 1489-97.
- [33] GAO S, CHUNG Y G, PARSEGHIAN M H, et al. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice [J]. *Dev Biol*, 2004, 266(1): 62-75.
- [34] WEN D, BANASZYNSKI L A, ROSENAK Z, et al. H3.3 replacement facilitates epigenetic reprogramming of donor nuclei in somatic cell nuclear transfer embryos [J]. *Nucleus*, 2014, 5(5): 369-75.
- [35] WEN D, BANASZYNSKI L A, LIU Y, et al. Histone variant H3.3 is an essential maternal factor for oocyte reprogramming [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20): 7325-30.
- [36] WANG F, KOU Z, ZHANG Y, et al. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos [J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(6): 1007-16.
- [37] LIU W, LIU X, WANG C, et al. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing [J]. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010.
- [38] LIU X, WANG Y, GAO Y, et al. H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming [J]. *Development*, 2018, 145(4): dev158261.
- [39] MATOBA S, LIU Y, LU F, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation [J]. *Cell*, 2014, 159(4): 884-95.
- [40] CHUNG Y G, MATOBA S, LIU Y, et al. Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(6): 758-66.
- [41] RUAN D, PENG J, WANG X, et al. XIST derepression in active X chromosome hinders pig somatic cell nuclear transfer [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(2): 494-508.
- [42] OKAE H, MATOBA S, NAGASHIMA T, et al. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(4): 992-1001.
- [43] MATOBA S, WANG H, JIANG L, et al. Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(3): 343-54.e5.
- [44] WU X, ZHANG Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(9): 517-34.
- [45] GUO F, LI X, LIANG D, et al. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4): 447-59.
- [46] GU T P, GUO F, YANG H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes [J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 606-10.
- [47] WU X, ZHANG H, ZHANG B, et al. Methylome inheritance and enhancer dememorization reset an epigenetic gate safeguarding embryonic programs [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(52): eabl3858.
- [48] DJEKIDEL M N, INOUE A, MATOBA S, et al. Reprogramming of chromatin accessibility in somatic cell nuclear transfer is DNA replication independent [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(7): 1939-47.
- [49] CHEN M, ZHU Q, LI C, et al. Chromatin architecture reorganization in murine somatic cell nuclear transfer embryos [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1813.
- [50] LATHAM K E. X chromosome imprinting and inactivation in preimplantation mammalian embryos [J]. *Trends Genet*, 2005, 21(2): 120-7.
- [51] YANG X, SMITH S L, TIAN X C, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295-302.
- [52] INOUE K, KOHDA T, SUGIMOTO M, et al. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer [J]. *Science*, 2010, 330(6003): 496-9.
- [53] MATOBA S, INOUE K, KOHDA T, et al. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(51): 20621-6.
- [54] YI M, HONG N, HONG Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells [J]. *Science*, 2009, 326(5951): 430-3.
- [55] LEEB M, WUTZ A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 2011, 479(7371): 131-4.
- [56] YANG H, SHI L, WANG B A, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2012, 149(3): 605-17.
- [57] LI W, SHUAI L, WAN H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice [J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 407-11.
- [58] ZHONG C, YIN Q, XIE Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 221-32.
- [59] ZHANG H, LI Y, MA Y, et al. Epigenetic integrity of paternal imprints enhances the developmental potential of androgenetic haploid embryonic stem cells [J]. *Protein Cell*, 2022, 13(2): 102-19.
- [60] BAI M, HAN Y, WU Y, et al. Targeted genetic screening in mice through haploid embryonic stem cells identifies critical genes in bone development [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(7): e3000350.